杂交瘤细胞体外大规模培养研究进展

孙静静，周伟伟，周雷鸣，赵巧辉*，李桂林

(郑州安图生物工程股份有限公司　郑州 450016)

摘要：单克隆抗体在生物学和医学研究领域中显示了极大的应用价值，是免疫检验中的新型试剂，是生物治疗的导向武器。作为医学检验试剂，单克隆抗体可以充分发挥其优势，特异性好，灵敏度高，更便于质量控制，利于标准化和规范化。传统的方法是利用小鼠腹水制备单克隆抗体，但是近几十年杂交瘤细胞体外大规模培养制备单克隆抗体技术也在不断发展。体外培养杂交瘤细胞生产的单克隆抗体已应用到许多方面，特别是单克隆抗体在疾病诊断和治疗方面的需求，更进一步促进了杂交瘤细胞体外培养生产技术的发展。由于杂交瘤细胞的半贴壁性质，因此无论是悬浮培养还是贴壁培养，均可进行杂交瘤细胞的体外大规模培养。本文针对应用于体外诊断试剂的杂交瘤细胞体外培养制备单克隆抗体进行综述，主要包括中空纤维细胞培养和生物反应器细胞养方法，以及不同培养方法优化的进展。

关键词：杂交瘤细胞；单克隆抗体；生物反应器；中空纤维

自 1975 年英国科学家 Milstein 和 Kohler 发明单克隆抗体（Monoclonal Antibody，McAb），开始了多克隆抗体走向单克隆抗体的新时代，与多克隆抗体相比，单克隆抗体具有无可比拟的优越性，它具有特异性高、效价高、纯度高、理化性状均一、重复性强、成本低并可大量生产等优点。单克隆抗体杂交瘤技术是当代免疫学中最重要的技术革命，它的问世极大地推动了医学一生物学的发展。单克隆抗体具有非常广阔的应用， 由杂交瘤细胞生产的单克隆抗体已应用到许多方面，特别是在体外诊断和疾病治疗等方面[1]。人用治疗的抗体药物主要采用基因工程重组抗体，由 CHO、SP20、NS0 等细胞表达，而基于杂交瘤细胞培养生产的单克隆抗体目前主要应用于诊断试剂及动物治疗。

目前大部分体外诊断用单克隆抗体的制备主要采用体内法，将杂交瘤细胞接种于小鼠腹腔内，杂交瘤细胞在小鼠腹腔内生长，并产生腹水，因而可得到大量的且抗体浓度很高腹水单抗。小鼠体内杂交瘤细胞培养，腹水中抗体含量浓度高，产量大，可持续抽取，不需要培养基等成本，不需要重复无菌操作，快速简便，但腹水中常混有小鼠的各种杂蛋白（包括 IgG）和脂类物质等，在很多情况下必须要提纯后才能使用，还有动物病毒污染的危险，另外由于小鼠个体差异较大，导致产品批间差较大。因此在无/低血清条件下的杂交瘤细胞的体外大量培养成为当前研究的主要方向[2]。杂

作者简介：孙静静（1986-），女，河南许昌，硕士研究生

Tel：15565079878，E-mail：sunjingjing@autobio.com.cn

*通讯作者：赵巧辉 E-mail:zhaoqiaohui@autobio.com.cn

交瘤细胞体外培养法制备单克隆抗体工艺的建立，通常需要经过以下 4 个阶段：小鼠骨髓瘤细胞的选择、细胞融合和单克隆筛选；鼠杂交瘤细胞体外培养方式的选择，杂交瘤细胞体外培养的工艺优化；纯化工艺的建立和优化。体外培养鼠杂交瘤细胞制备单克隆抗体主要有两种方式，中空纤维系统培养和生物反应器培养，中空培养系统的优势有： ①细胞密度高(> 1 0^8cells /m l) ，② 营养物质能有效地分布，代谢废物能及时除去，③维持时间长，可达数月，特别适于长期连续培养，④培养系统占用空间小；劣势有：①放大困难，适用于年需求量小于 10g 的产品，②耗材为一次性的且价格稍高，一旦出现污染，就必须废弃耗材，增加成本。生物反应器培养的优势有：①易放大，几升到几百升甚至几千升均可，②工艺成熟稳定，③根据不同的需求，可以选择不同的培养工艺，批式培养，流加补料培养或者灌流培养；劣势有：①培养液抗体浓度偏低； ②下游纯化体积较大。本文针对体外诊断用单克隆抗体，综述杂交瘤细胞两种培养系统的特点、选择、培养工艺的优化以及目前的研究进展和应用成果。

1.杂交瘤细胞的特点和培养方式

鼠交瘤细胞系是由小鼠骨髓瘤细胞与免疫小鼠的脾细胞融合形成的。 一般来讲，鼠杂交瘤细胞不是一种严格的贴壁依懒性细胞（ADC，Anchorage dependent cell），属于半贴壁性质的细胞，既可以贴壁培养，也可以悬浮培养，但不同的细胞系之间的贴壁依赖性有差异。中空纤维系统主要是贴壁培养，生物反应器培养既可进行悬浮培养，又可借助微载体进行贴壁培养。体外诊断用单克隆抗体与治疗用单克隆抗体的需求量不同，体外诊断用抗体的年需求量比较少，一般 10-100g/年，但是细胞株种类较多，个别特殊用途抗体如阻断剂的年需求量最多可达 1-2kg/年，而生物制药用抗体需求量一般 100-1000kg/年[3-4]。

生物反应器是最常用的制备单克隆抗体方法，在诊断试剂行业，转瓶和中空纤维系统也较常用。培养方式包括批式培养、流加补料培养和灌流培养，灌流培养是最有效的生产小规模单克隆抗体的方法，中空纤维系统是灌流培养，生物反应器系统既可以进行批式培养或者流加补料培养，也可进行灌流培养。灌流培养可以不断加入新鲜的培养基，排出代谢废，从而使细胞快速达到高密度，高细胞密度可以实现高抗体分泌和高产能，有研究表明，灌流培养的产能比批式或流加培养高 10 倍多[5]。Raisa V 等[6]统计比较了生物反应器和中空纤维系统制备单克隆抗体的区别，包括成本区别（如图 1 和图 2 所示）和产能区别（如表 1 所示）。成本包括直接成本和间接成本，直接成本包括核心原材料、耗材、杂项、人力、QA/QC，间接成本包括通用设备、维持费用和折旧费，两者的主要区别是生物反应器设备折旧费占比较高，达 39%，而中空系统设备折旧费占 25%，中空系统比生物反应器系统多出 10%的耗材成本；产能区别，10L 生物反应器灌流培养年产能 425g，抗体浓度 0.17mg/mL，单根 70mL 中空纤维柱批产能 10.6g，年生产 5 批，每批次同时培养 8 根中空纤维柱子，

可实现年产能 425g，每 g 抗体的成本，两者差别不大，生物反应器比中空纤维系统高 7%。

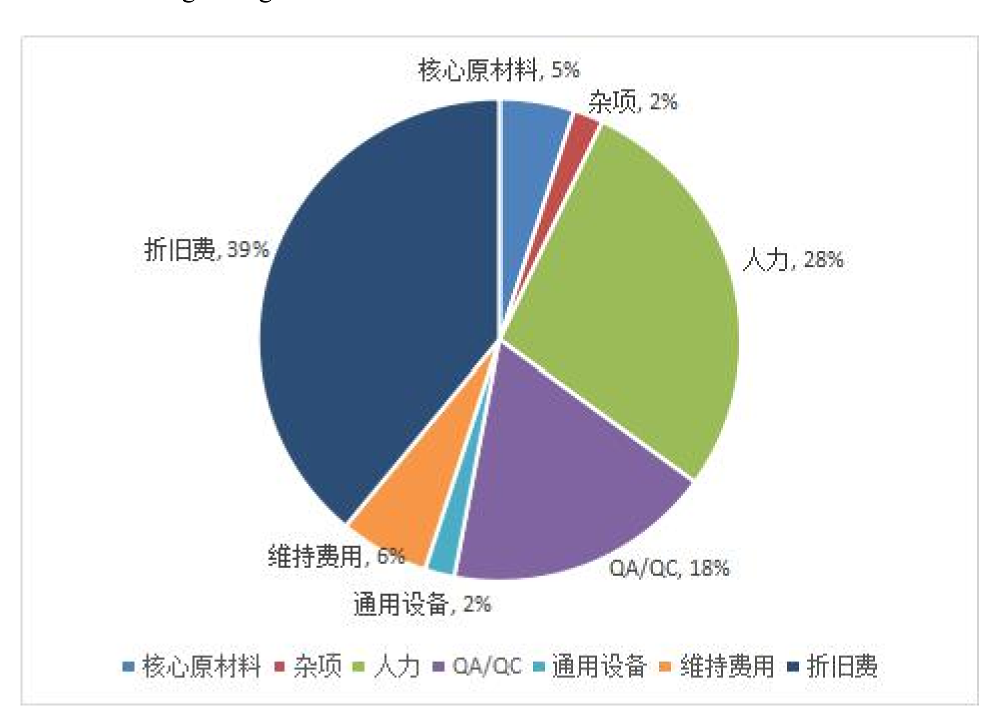


图 1 生物反应器制备单克隆抗体上游成本，直接成本 52%，间接成本 48%

Fig.1 The cost distribution of direct (52%) and indirect (48%) costs in the stirred-tank bioreactor upstream section.

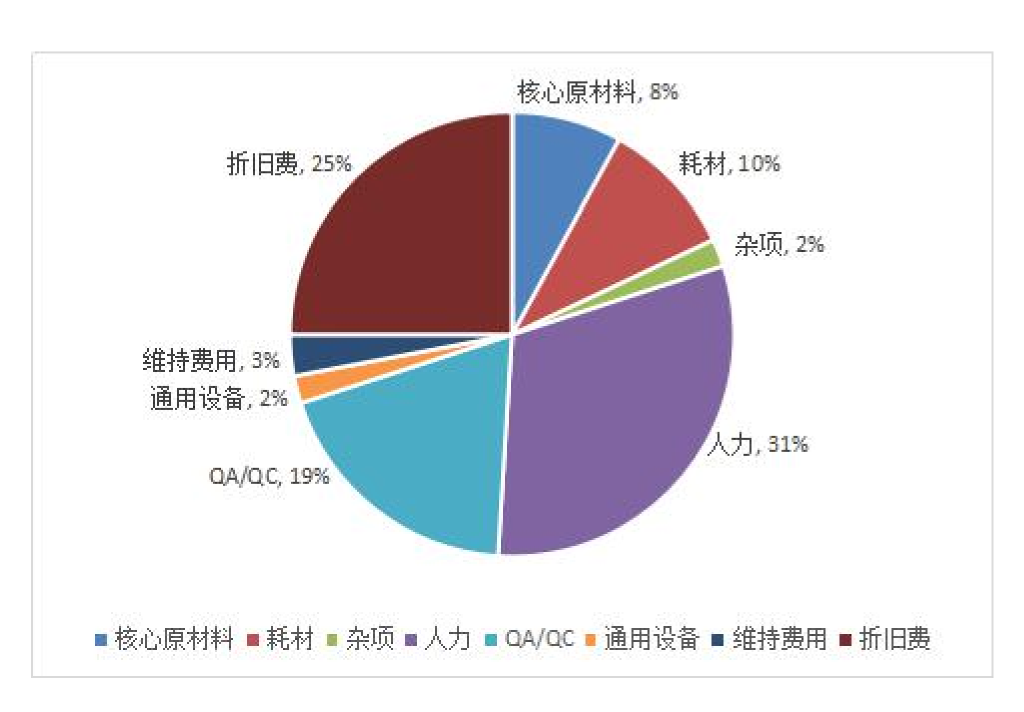


图 2 中空纤维系统制备单克隆抗体上游成本（直接成本 70%，间接成本 30%）

Fig.2The cost distribution of direct (70%) and indirect (30%) operating costs in the hollow fiber bioreactor upstream section.

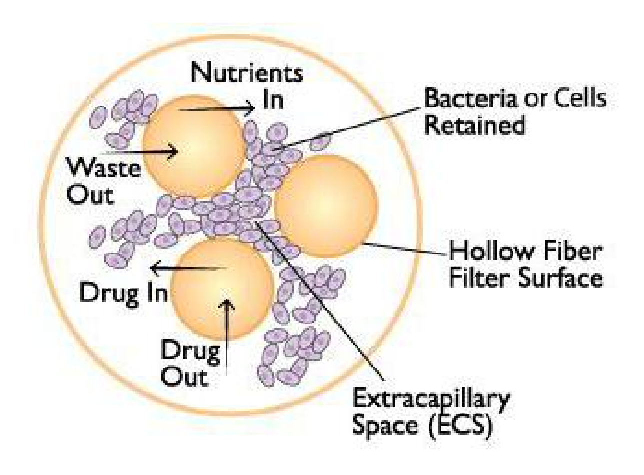
表 1　生物反应器和中空纤维系统比较（425g/年产能）

Table 1 MAb Cultivation Data (Per Batch) of the Stirred-Tank Bioreactor (STR) and Hollow Fiber Bioreactor (HFB) Production of Total 425g of Monoclonal Antibodies/Year

	生物反应器(旋转过滤器)	中空纤维系统（1 柱）	中空纤维系统（8 柱/批）
中空柱外腔体积	-	70mL	70mL
生物反应器体积	10L	-	-
接种密度	10^5cells/mL	10^8cells	10^8cells
最大细胞密度	10^7cells/mL	10^8cells/mL	10^8cells/mL
抗体比生产速率	20pg/cell/d	20pg/cell/d	20pg/cell/d
抗体生产速率	0.2mg/mL/d	400mg/2d	3.2g/2 天
生长阶段培养基消耗量	10L	3.75L	30L
生产阶段培养基消耗量	12L/d	2L/d	16L/d
每批培养基总消耗量	265L	110L	880/L
收获体积	12L/d	70mL/2d	560mL/2d
每批收获总体积	225L	1.86L	14.9L
抗体浓度	0.17mg/mL	5.7mg/mL	5.7mg/mL
批产能	42.5g	10.6g	85g
批周期	29d/批 10 批/年	60d/批	60d/批 8 柱/批 5 批/年

2.中空纤维系统培养杂交瘤细胞

20 世纪 70 年代初期出现中空纤维细胞培养技术，1972 年 Knazek 等报道了他们设计、制造的小型中空纤维细胞培养装置及细胞培养的实验结果，证实细胞能在中空纤维上形成类似组织的多层细胞[7] 。目前美国有多家公司在进行中空纤维系统的研发和生产，如 FiberCell 公司、Cell Culture Company 公司等。中空纤维系统可以在很小的体积内提供非常大的表面积 ，FiberCell 公司有柱腔体积为 15mL 的中号中空纤维生物反应器（ C2011 and C2008， FiberCell Systems），能提供 2200cm^2 的表面积，也有柱腔体积为 60mL 的较大的反应器（C2018 和 C2003） 可以提供 1.2 m^2 的表面积。Cell Culture Company 可以提供柱腔体积为 150mL 的反应器，可以提供 2.1m^2 的表面积。



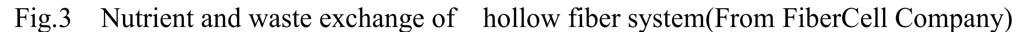


图 3. 中空纤维系统物质交换（来自 FiberCell 公司）

Fig.3 Nutrient and waste exchange of hollow fiber system(From FiberCell Company)

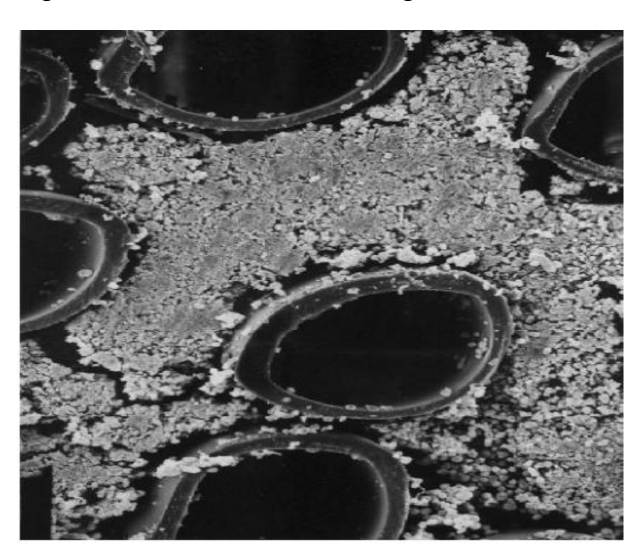


图 4 中空纤维细胞培养横截面（来自 FiberCell 公司）

Fig.4 The cross section of in-culturing hollow fiber system (From FiberCell Company)

中空纤维生物反应器的一个特点是培养的细胞密度可以超过 10^8cells/mL，可以获得较高浓度抗体；中空纤维生物反应器和其他细胞培养技术的另一个基本区别在于：中空纤维能形成易于细胞附着的多孔渗滤支撑，最类似于活体内的细胞生长方式，由于营养输送是由下至上的，因此细胞很容易彼此堆积，形成一个具有多层细胞的层面。中空纤维生物反应器的第三个特点是可通过中空纤维膜孔径（或截留分子量）选择性地控制不同分子量物质进出中空纤维膜，营养物物质和代谢废物进行交换，带进来营养物质，排出代谢废物，而目标产物一直累积，不能透过中空纤维膜。最常见的例子是用于杂交瘤细胞株生产单克隆抗体，这是中空纤维生物反应器的第一次大规模应用。功能型的中空纤维膜的孔径是 20-30KD，中空纤维柱内循环是含血清的培养基，不断提供营养物质，外循环是细胞生长的空间，内循环培养基中的氨基酸、无机盐、维生素以及血清中的小分子物质可以透过中空纤维膜供细胞利用，外循环细胞代谢产生的乳酸以及葡萄糖等代谢废物可以通过中空纤维膜被带走，每天更换内循环培养基，收获外循环抗体，从而实现杂交瘤连续培养，长期收获目标抗体[8]。由于中空纤维系统表面积大而培养体积小，且细胞数量可达 10^9 以上，因此收获的抗体浓度相对较高。中空纤维培养系统的培养周期较长，根据需求一般在 1-6 个月不等[9]。

Legazpi 等[10]用分子截留量为 30KD，表面积为 2050cm2 的中空纤维柱培养 HB-8852 杂交瘤细胞，在整个培养过程中，葡萄糖的含量从 4.5g/L 逐渐降低到 3g/L，谷氨酰胺的含量从 0.4g/L 逐渐降低到 0.2g/L，连续培养 16 天，抗体分泌 0.27mg/mL，揭示了中空纤维系统培养杂交瘤细胞的代谢动力学，但此细胞株的抗体分泌能力相对偏低，摇瓶培养抗体分泌 0.03mg/mL。R van Erp 等[11]应用中

空纤维系统培养鼠杂交瘤细胞制备 2 株 hCG 单克隆抗体，转瓶培养制备细胞种子，制备种子时用含 10%血清的 DMEM/F12 培养基，将处于对数期的细胞以 5×10^6 cells/mL 的密度接种到中空纤维系统外腔，接种后 2 周，以 2 次/周的频率收获中空纤维系统外腔液，可以连续培养 80 天，细胞密度平均可达到 7×10^7cells/mL，抗体分泌平均可达到 4mg/mL。Jackson 等[12]评价了用体外法中空纤维系统培养杂交瘤细胞制备单克隆抗体替代体内腹水法制备单克隆抗体的可行性，选取 3 株杂交瘤细胞，分别用体内法和体外法中空纤维系统制备单克隆抗体，制备周期 65 天，结果表明，细胞株 2B11，体内法产量 455 mg，体外法产量 211mg，细胞株 3C9，体内法产量 446 mg ，体外法产量 565 mg，细胞株 RMK，体内法产量 997 mg ，体外法产量 1023 mg，体内腹水法平均的抗体浓度为 4.07mg/mL-8.37 mg/mL，体外中空纤维培养平均的抗体浓度 0.71mg/mL-11.1mg/mL，证明了中空纤维可以用于年需求量 5g 以下抗体的体外制备。

3.生物反应器培养杂交瘤细胞

杂交瘤细胞培养系统有多种不同的类型和规模，包括滚瓶细胞培养系统、搅拌式生物反应器、气升式生物反应器和一次性生物反应器，每一种生物反应器都有其自身的特点和应用，培养规模从几升、几十升、几百升到几千升不等，目前行业应用最广泛的是搅拌式生物反应器。但由于不同株的杂交瘤细胞的抗体分泌能力不同，对营养需求的需求也可能有差别，最适应的培养基也可能不同。鼠杂交瘤细胞体外培养产生单克隆抗体，受很多因素的影响，促进剂、抑制剂以及添加物等，许多科学采取多种方式提高体外杂交瘤细胞培养生产单抗的能力，如基因工程改造、单克隆重新筛选、营养物质优化等[13]。用生物反应器培养杂交瘤细胞需对生物反应器控制参数和营养物质进行双重调控[14]。

3.1 生物反应器参数调控

最经济有效的单抗制备过程，需要充分理解生物反应器程参数对细胞生理过程的影响，因此必须评估细胞生长、营养消耗和抗体分泌的动力学参数，这些参数对工艺放大也是十分有用的[11]。Ayyildiz TD 等[15]比较了滚瓶培养系统(Modular Cell Production Roller Culture Apparatus)、搅拌式生物反应器（Biostat B plus cc, Sartorius，5L）和一次性细胞静止培养系统（CELLine CL350， Sartorius ）培养 A5A8 株杂交瘤细胞，制备抗沙门氏菌 O 型特异性抗原的单克隆抗体，以期了解不同的生物反应器过程参数对单抗制备的影响，如细胞密度、细胞活率、葡萄糖和谷氨酰胺消耗、乳酸和氨的产生以及抗体的分泌等。结果表明，当细胞在 10% 血清 DMEM/F12 培养基中培养，生物反应器培养优于一次性细胞静止培养系统，一次性细胞静止培养系统优于滚瓶培养系统，三者的抗体比生产速率分别为 20mg/L/d、16mg/L/d、5mg/L/d。

最常用的搅拌式生物反应器，在培养过程中影响细胞生长和抗体产能的因素包括：生物反应器

过程参数，比如温度[16]、溶氧[17]、pH[18]、搅拌[19]；营养物质和代谢废物，如葡萄糖[20]、氨基酸[21]和肾上腺皮质酮[22]；以及诱导抗体分泌的化学物质，如丁酸钠[23]。当然这些因素的变化，也有可能影响抗体的电荷分布[24]、糖型[25]以及可能会出现结晶现象[26]。如下表所示：

表 2　常见的培养过程参数变化产生影响

Table2　Previous Studies That Guided Process Variable Selection

过程参数变化	效应	参考文献
溶氧 DO%（升高）	mAb Qp（升高） qGluc（降低） qLac（降低）	[17]
通气（升高）	气泡增多 活细胞密度（降低）	[27]
温度改变（降低）	qGrowth rate（下降） mAb Qp（升高） qGluc（降低） qLac（降低）	[16]
接种密度	抗体电荷分布改变	[24]
pH 改变（降低）	qGrowth rate（下降） 活细胞密度（升高） 抗体分泌（升高）	[18]
补料	抗体分泌（升高）	[20]
非必须氨基酸	抗体分泌（升高），而不影响糖型	[21]
脂肪酸	抗体分泌（升高）	[28]
皮质醇	细胞活率（升高） 抗体分泌（升高	[22]

Agarabi CD 等[29]利用 DOE 实验设计中 Plackett–Burman 设计方法，设计了 12 组实验，验证了 2 水平 11 个参数对生物反应器培养杂交瘤细胞制备鼠 IgG3 单抗的影响，11 个参数包括溶氧、温度、搅拌、通气、接种密度、pH、变温、补料策略、非必须氨基酸、脂肪酸和皮质醇。结果表明，12 组实验抗体分泌在 20mg/L-120mg/L 不等，其中生物反应器过程参数对细胞密度并无产生持续的显著影响，但搅拌速度和温度对细胞密度的影响比添加脂肪酸要显著；适当水平的葡萄糖和谷氨酰胺对细胞生长和抗体分泌有利；不同补料策略对细胞生长和抗体分泌影响不大；温度降低至 34℃后，抗体产量降低，有趣的是也有研究表明温度降低后抗体产量升高。

3.2　营养物质优化

杂交瘤细胞体外批式培养细胞密度和抗体分泌均不高[30]。Jo EC 等[31]体外培养分泌抗 HBsAg 单抗的杂交瘤细胞株，主要在三角瓶中培养，采用重复加强补料的策略，应用特定的基础培养基和补料培养基，培养培养基所含的营养是 RPMI-1640 基础培养基的 50 倍，补料的依据是葡萄糖浓度维

持在 1g/L，每天补加 10%初始体积的补料，同时去除 10%体积，以维持培养体积的稳定，70h 达到最高细胞密度 1×10^7cells/mL，之后细胞密度在 0.5×10^7 cells/mL 维持 2500h，抗体分泌达到 1g/L 维持 2500h。

众所周知，细胞培养过程中导致细胞死亡的不仅仅是葡萄糖或氨基酸的缺乏，还包括代谢毒素的累积，如谷氨酰胺代谢产生的氨和糖酵解产生的乳酸等。适当降低葡萄糖和谷氨酰胺的浓度，可以减少氨、乳酸等代谢废物的累积，但如果葡萄糖和谷氨酰胺的浓度过低，而补料不能及时供应细胞生长所需的营养物质，也可能导致细胞快速死亡。因此需合理控制营养物质的浓度，使细胞不因营养物质缺乏而死亡，也不因代谢废物累积而死亡[32-34] 。20 世纪 90 年代，Liangzhi Xie 等[35-37]做了大量工作，通过研究杂交瘤细胞代谢动力学进行培养基和补料研究，分析细胞生长代谢所需的营养物质和能量，进行流加补料培养，最大活细胞密度从 6.3×10^6cell/mL 提高到 1.7×10^7cells/mL，培养周期从 340h 提高到 550h，最终抗体分泌达 2400mg/L，葡萄糖转化成乳酸的比例由 67%降低至 3.4%。

常规杂交瘤细胞培养用含血清的基础培养基，DMEM 或者 DMEM/F12 均可，但是随着无血清培养基技术的发展，也出现了多种杂交瘤细胞无血清培养基和低血清培养基。Keisuke S 等[38]研发出了一种血清替代物，用于体外培养可分泌人纤连蛋白单克隆抗体的鼠杂交瘤细胞 CRL-1606（购自 ATCC），此血清替代物包含 12 种组分，胰岛素（0.017mM）、转铁蛋白（0.0013mM）、对氨基苯甲酸（0.015mM）、盐酸吡哆醇（0.11mM）、亚硒酸钠（0.00038mM）、丙酮酸钠（7.5mM）、次黄嘌呤二钠（0.074mM）、亚油酸（0.00073mM）、硫辛酸（0.0025mM）、腐胺（0.0025mM）、胸苷（0.0075mM）、谷胱甘肽（0.0081mM）。生物反应器（1L,Able Co, Japan ）培养体积为 800mL，根据细胞的营养物质消耗情况，每 12h 进行一次补料，整个培养过程持续了 25d，最大活细胞密度达 3×10^6cells/mL，抗体分泌 400mg/L，抗体分泌较补料前提升了 5 倍。 Chua GK 等[39]研制了一种低血清培养基，DMEM 基础培养基添加 0.4%胎牛血清、311.8 mM 柠檬酸铁、17.3 nM sodium 亚硒酸钠和 4.5 mM 硫酸锌，相比对照组用 2%胎牛血清，低血清培养基成本降低 64.6%，而单细胞抗体分泌能力提升了 3 倍。

Marc Cherlet 等[40]应用 2L 生物反应器培养可分泌人 T 淋巴细胞 CD3 单抗的杂交瘤细胞，验证了丁酸盐对杂交瘤细胞的影响，丁酸盐可以促进杂交瘤细胞抗体分泌，但会抑制杂交瘤细胞的生长，因此要选择合适的时间进行添加合适浓度的丁酸盐，在细胞对数期进行 1mM 丁酸盐的添加，抗体分泌可提高 1 倍。Rokni M 等[41]研究了微量元素全反式维甲酸（ATRA）和不饱和脂肪酸二十二碳六烯酸（DHA）在体内和体外对鼠杂交瘤细胞抗体分泌的影响，设置了 3 个实验组和 1 个对照组，单独添加 ATRA，单独添加 DHA ，配合添加 ATRA 和 DHA，结果表明单独添加 1 μM ATRA 或 10 μM

DHA ，抗体分泌有了提升，其中 ATRA 的促进效果优于 DHA ，配合添加 0.5 μM ATRA 和 5 μM of DHA 也可促进抗体分泌，与单独添加 10 μM DHA 的除抗体分泌效果基本一致，抗体分泌提高 1 倍。. Konno Y 等[42] 的研究表明添加辅酶 Q10 也可促进抗体的分泌。

4.展望

随着单克隆抗体技术的发展，已经开发出成千上万的分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株，体外杂交瘤细胞培养大规模培养方法和设备也在不断的发展。对于快速发展体外诊断领域，单克隆抗体的需求量不断增加，小鼠饲养规模的限制以及法规环评的限制会进一步促进杂交瘤细胞体外培养技术的快速发展，目前有多家体外诊断企业均在进行杂交瘤细胞体外培养技术研发，同时对于诊断试剂用部分抗体，也在积极进行重组抗体开发，以期提高抗体质量。

参考文献：

[1] 张元兴，魏明旺，董志峰。杂交瘤细胞的大量培养[J].生物工程进展，1997,17(5):54-60。

[2] 辛彦斌，薛小平，朱美福等。 杂交瘤细胞体外大量培养研究的进展[J]，细胞与分子免疫学杂志,1990,6(2):63-66。

[3] Carson KL. Flexibility-the guiding principle for antibody manufacturing[J]. Nat Biotechnol. 2005 ,23(9):1054-1058.

[4] Rodrigues ME, Costa AR, Henriques M, et al. Technological progresses in monoclonal antibody production systems[J]. Biotechnol Prog. 2010,26(2):332–351.

[5] Heine H, Biselli M, Wandrey C. High cell density cultivation of hybridoma cells: spin filter vs. immobilized culture[J]. Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products, 1999:83–85.

[6] R,Hurme M.Economic Comparison of Diagnostic Antibody Production in Perfusion Stirred Tank and in Hollow Fiber Bioreactor Processes [J].Biotechnology Progress， 2011，27 (6) :1588-1598.

[7]李峻城，姜述德等。中空纤维细胞培养技术[J]. 《国外医学:预防.诊断》 , 1989 (1) :1-4.

[8] John JS.中空纤维细胞培养的新进展[J].中国实验室，2005,4:21-27.

[9]Jain, E., Kumar, A., Upstream processes in antibody production: Evaluation of critical parameters, Biotechnol. Adv.26 (2008) 46.

[10]Legazpi L , Lacab A , Collado S, et al.Diffusion and Inhibition Processes in a Hollow-fiber Membrane Bioreactor for Hybridoma Culture. Development of a Mathematical Model.Chem. Biochem. Eng. Q., 2016,30 (2): 213–225

[11] Van ER ， Adorf M ，Sommeren AP ,et al. Monitoring of the production of monoclonal antibodies by hybridomas. Part I: Long-term cultivation in hollow fibre bioreactors using serum-free

medium[J].Journal of Biotechnolog, 1991,20 (3) : 249-261.

[12] Jackson LR，Trudel ILJ，Fox JG.Evaluation of hollow fiber bioreactors as an alternative to murine ascites production for small scale monoclonal antibody production.J Immunol Methods, 1996,189(2):217-231.

[13]Takenouchi S, Sugahara T. Lactate dehydrogenase enhances immunoglobulin production by human hybridoma and human peripheral blood lymphocytes,Cytotechnology,2003,42 (3) :13343. 2002,15（5）:315-318.

[14] Jain E,Kumar A.Upstream processes in antibody production: Evaluation of critical parameters[J] .Biotechnology Advances, 2008,26(1):46-72.

[15] Ayyildiz-Tamis D, Nalbantsoy A, Elibol M,et al.Effect of Operating Conditions in Production of Diagnostic Salmonella Enteritidis O-Antigen-Specific Monoclonal Antibody in Different Bioreactor Systems[J].Appl Biochem Biotechnol,2014 ,172(1):224-36.

[16] Chen ZL, Wu BC, Liu H, et al.Temperature shift as a process optimization step for the production of pro-urokinase by a recombinant Chinese hamster ovary cell line in high-density perfusion culture[J]. J Biosci Bioeng,2004,97(4):239–243.

[17] Ogawa T, Kamihira M, Yoshida H, et al. Effect of dissolved-oxygen concentration on monoclonal-antibody production in hybridoma cell-cultures[J]. J Ferment Bioeng,1992, 74(6):372–378.

[18] Trummer E, Fauland K, Seidinger S, et al. Process parameter shifting: Part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors[J]. Biotechnol Bioeng ,2006,94(6):1033–1044.

[19] Abu-Reesh I, Kargi F. Biological responses of hybridoma cells to hydrodynamic shear in an agitated bioreactor[J]. Enzyme Microb Technol,1991, 13(11):913–919.

[20] Lu F, Toh PC, Burnett I, et al. Automated dynamic fed-batch process and media optimization for high productivity cell culture process development[J]. Biotechnol Bioeng,2013,110(1):191–205.

[21] Read EK, Bradley SA, Smitka TA, et al. Fermentanomics informed amino acid supplementation of an antibody producing mammalian cell culture[J]. Biotechnol Prog,2013, 29(3):745–753.

[22] Rouiller Y, Perilleux A, Marsaut M, et al. Effect of hydrocortisone on the production and glycosylation of anFc-fusion protein in CHO cell cultures[J]. Biotechnol Prog,2012, 28(3):803–813.

[23] Madhavarao CN, Agarabi CD, Wong L, et al. Evaluation of butyrateinduced production of a mannose-6-phosphorylated therapeutic enzyme using parallel bioreactors[J]. Biotechnol Appl

Biochem,2014, 61(2):184–192.

[24] Banerjee A, Ma NN, Ramasubramanyan N. Designing in quality: Approaches to defining the design space for a monoclonal antibodyprocess[J]. Biopharm Int ,2010,23(5):26–40.

[25] Chee Furng Wong D, Tin Kam Wong K, Tang Goh L, et al. Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures[J]. Biotechnol Bioeng,2005, 89(2):164–177.

[26] Hasegawa H, Wendling J, He F, et al. In vivo crystallization of human IgG in the endoplasmic reticulum of engineered Chinese hamster ovary (CHO) cells[J]. J Biol Chem,2011, 286(22):19917–19931.

[27] Handa A, Emery AN, Spier RE.On the evaluation of gasliquid interfacial effects on hybridoma viability in bubble column bioreactors[J]. Developments in biological standardization ,1987,66(4):241–253.

[28] Butler M, Huzel N. The effect of fatty acids on hybridoma cell growth and antibody productivity in serum-free cultures[J]. Journal of biotechnology, 1995, 39(2):165–173.

[29]Agarabi CD, Schiel JE, Lute SC,et al.Bioreactor Process Parameter Screening Utilizing a Plackett–Burman Design for a Model Monoclonal Antibody[J].J Pharm Sci. 2015,104(6):1919-1928.

[30]Zhang, L, Shen, H, Zhang, Y.Fed-batch culture of hybridoma cells in serum-free medium using an optimized feeding strategy, J. Chem. Technol. Biot. 79 (2004) 171.doi: http://dx.doi.org/ 10.1002/jctb.940

[31] Jo EC, Park HJ, Kim DI,et al.Repeated Fed-Batch Culture of Hybridoma Cells in Nutrient-Fortified High-Density Medium[J] .Biotechnol Bioeng, 1993 , 42(10):1229-1237.

[32]郭纪元。CHO DG44 稳定细胞株无血清培养基的研发与优化[M]。厦门大学硕士论文，2014.

[33]刘美。GS-CHO 细胞培养工艺优化[M]。东北农业大学硕士论文，2012.

[34]蒋金龙。基于脂类代谢的 DHFR-CHO 细胞培养过程开发与优化[M]。华东理工大学硕士论文，2015.

[35] Xie L, Wang DI.Applications of improved stoichiometric model in medium design and fed-batch cultivation of animal cells in bioreactor[J]. Cytotechnology,1994, 15(1):17–29.

[36] Xie L, Wang DI.Fed-batch cultivation of animal cells using different medium design concepts and feeding strategies[J]. Biotechnol Bioeng ,1994,43(11): 1175–1189.

[37] Xie L, Wang DI.Different Medium Design Concepts andFeeding Strategies[J].,Biotechnology and Bioengineering,1993,95(2):271-284.

[38] Shibuya K1, Haga R, Namba M.A serum substitute for fed-batch culturing of hybridoma cells[J]. Cytotechnology, 2008,57(2):187-197.

[39]Gek Kee Chua.Development of a low serum medium for the production of monoclonal antibody against congenital adrenal hyperplasia by hybridoma culture. Preparative Biochemistry and Biotechnology，2016，DOI: 10.1080/10826068.2015.1135450

[40]Cherlet M, Marc A.Stimulation of monoclonal antibody production of hybridoma cells by butyrate: evaluation of a feeding strategy and characterization of cell behaviour[J]. Cytotechnology, 2000 ,32(1):17-29.

[41]Roknia M,Razavia AR, Shokri F,et al.Enhancement of monoclonal antibody production after single and combination treatment of the hybridoma cells with all-trans retinoic acidand docosahexaenoic acid: An in vitro and in vivo study.International Immunopharmacology 59 (2018) 295–300

[42]Konno Y,　Aoki M.Takagishi,, M.　et al., Enhancement of antibody production by the addition of coenzyme-Q (10), Cytotechnology 63 (2) (2011) 163－170.

Advance in large-scale culture of hybridoma cells in vitro

SUN Jing-jing，ZHOU Wei-wei，ZHOU Lei-ming，ZHAO Qiao-hui*，LI Gui-lin

(*Zhengzhou Autobio diagnostic Co.,LTD,Zhengzhou* 450016*,China*)

Abstract：Monoclonal antibodies have shown great value in the field of biology and medical research. They are new reagents in immunoassays and are the guided weapons for biological therapy. As a in vitro diagnostic reagent, monoclonal antibody can give full play to its advantages, good specificity, high sensitivity, and more convenient for quality control, which is conducive to standardization .Traditionally,mouse ascites were used to prepare monoclonal antibodies, is mainly used in the field of in vitro diagnostic. And now monoclonal antibodies are also being developed in large-scale cultures of hybridoma cells in vitro. In particular, the needs of monoclonal antibodies in the diagnosis and treatment of diseases have further promoted the development of in vitro culture and production techniques for hybridoma cells. Due to the semi-adherent nature of the hybridoma cells, both in suspension and adherent culture, large-scale in vitro culture of hybridoma cells can be performed. This article reviews the in vitro culture techniques of hybridoma cells, including hollow fiber cel culture system and bioreactor cell culture sysytem, as well as the optimization of different culture methods.

Key Words：Hybridoma;　Monoclonal antibody; Bioreactor; Hollow fiber

中文文献英文对译：

[1] 张元兴，魏明旺，董志峰。杂交瘤细胞的大量培养[J].生物工程进展，1997,17(5):54-60。

[1]Zhang Yuan-xing, Wei,Ming-wang ,Dong Zhi-Feng.Large-Scale Culture of Hybr idoma Cells[J]. Advances in Environmental Bioengineering,1997,17(5):54-60.

[2] 辛彦斌，薛小平，朱美福等。 杂交瘤细胞体外大量培养研究的进展[J]，细胞与分子免疫学杂志,1990,6(2):63-66。

[2]Xin Yan-bin,Xue Xiao-ping,Zhu Mei-Fu,et al.Advances of Large-Scale Culture of Hybridoma Cells in Vitro[J]. Journal of Cellular and Molecular Immunology,1990,6(2):63-66.

[7]李峻城，姜述德等。中空纤维细胞培养技术[J].《国外医学:预防.诊断》, 1989 (1) :1-4.

[7]Li Jun-cheng,Jiang Shu-de.Hollow fiber cell culture technology[J].Foreign medicine: prevention. Diagnosis, 1989 (1) :1-4.

[8] John JS.中空纤维细胞培养的新进展[J].中国实验室，2005,4:21-27.

[8]John JS.New Developments in Hollow-Fiber Cell Culture [J].CHINA LABORATORY, 2005,4:21-27.

王祥斌，孔健。体外培养杂交瘤细胞生产人用鼠源单克隆抗体。中国生物制品学杂志，2002,15

[32]郭纪元。CHO DG44 稳定细胞株无血清培养基的研发与优化[M]。厦门大学硕士论文，2014.

[32]Guo Ji-Yuan.Development and optimization of the serum-free medium for CHO DG44 stable cell line[M].Master's Thesis of Xiamen University ,2014.

[33]刘美。GS-CHO 细胞培养工艺优化[M]。东北农业大学硕士论文，2012.

[33]Liu Mei.Process optimization for GS-CHO cells cultre[M].Master thesis of northeast agricultural university.

[34]蒋金龙。基于脂类代谢的 DHFR-CHO 细胞培养过程开发与优化[M]。华东理工大学硕士论文，2015.

[34]Jiang Jin-long.Process development and optimization for DHFR-CHO cells based on lipid metabolism.Master thesis of East China University of Science and Technology,2015.